

# Bezpieczeństwo krwi — badania przesiewowe w celu wykrywania zanieczyszczeń bakteryjnych w składnikach krwi

Karolina Janik

Pracownia Transfuzjologii Laboratoryjnej z Bankiem Komórek Krwiotwórczych,  
Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Zapewnienie odpowiedniego poziomu bezpieczeństwa i jakości krwi oraz jej składników jest niezwykle istotnym zadaniem. W czasie XXXI ISBT w Berlinie poświęcono temu tematowi 8 sesji, podczas których omawiano między innymi takie zagadnienia, jak: badania przesiewowe na obecność zanieczyszczeń bakteryjnych w składnikach krwi, badania przesiewowe dawców krwi, inaktywacja czynników chorobotwórczych, choroby zakaźne przenoszone drogą krwi, poprzetoczeniowe zakażenia pasożytami, poprzetoczeniowe zapalenie wątroby.

Konieczność zapewnienia bezpiecznej krwi i jej składników motywuje do poszerzania wiedzy na temat zagrożeń związanych z transfuzją oraz do poszukiwania nowych, lepszych rozwiązań w zakresie jej badania.

Jednym z zagrożeń są zakażenia bakteryjne, na ogół spowodowane zanieczyszczeniem składnika krwi w trakcie jego przechowywania lub zakażeniem dawcy bakteriami znajdującymi się na skórze lub na niesterylnym zestawie do przetoczeń. Zakażenia te zalicza się do powikłań wczesnych, obserwowanych w ciągu pierwszych 24 godzin po przetoczeniu.

Zakażenia bakteryjne mogą być przyczyną poważnych chorób, a nawet śmierci pacjentów, którym przetoczono krew lub składniki krwi. Zagrożeniom takim można przeciwdziałać, stosując różne środki zapobiegawcze oraz metody wykrywania zakażeń bakteryjnych.

Wood, przedstawiciel Australijskiego Czerwonego Krzyża, omówił metody wykrywania zakażeń bakteryjnych, w tym badania przesiewowe składników krwi [1]. Do środków zapobiegających zakażeniom zaliczył: rygorystyczne kryteria kwalifikacji dawców na podstawie ich stanu zdrowia przed po-

braniem krwi, wyraźnie określone kryteria dyskwalifikacji dawców, optymalizację procesów pobierania i preparatyki krwi, w tym doskonalenie procedur dezynfekcji skóry, wybór odpowiedniej metody pobierania krwi, stosowanie właściwego sprzętu i materiałów, odrzucenie pierwszych pobranych mililitrów krwi, monitorowanie środowiska, częstsze stosowanie KKP z aferezy, doskonalenie metod inaktywacji czynników chorobotwórczych oraz zapewnienie odpowiednich warunków przechowywania składników krwi.

Pomimo stosowania coraz bardziej udoskonalonych i skutecznych środków zapobiegawczych nadal pojawiają się doniesienia o poważnych i niepożądanych zdarzeniach w wyniku zakażeń bakteryjnych. We Francji, mimo że liczba zgłaszanych zakażeń zmniejsza się z każdym rokiem (począwszy od 2000 roku), w 2008 roku odnotowano dziewięć poprzetoczeniowych powikłań klinicznych, w tym jedno zakażenie bakterią *Escherichia coli*, które doprowadziło do zgonu pacjenta. W tym samym roku w Wielkiej Brytanii odnotowano 6 klinicznie potwierdzonych, śmiertelnych przypadków sepsy spowodowanych zakażeniem bakteryjnym (coroczne sprawozdanie w programie „Poważne zagrożenia związane z Transfuzją” [SHOT, *Serious Hazard of Transfusion*]).

Niełatwo jest potwierdzić przypadek poprzetoczeniowej sepsy, zwłaszcza u pacjenta, u którego wcześniej wystąpiła gorączka i/lub który przyjmował antybiotyki z powodu sepsy pochodzącej z innego źródła. Przypadki zakażeń bakteryjnych muszą być zidentyfikowane klinicznie, potwierdzone odpowiednimi badaniami, a następnie zgłoszone według procedur obowiązujących w programie SHOT.

**Adres do korespondencji:** mgr Karolina Janik, Pracownia Transfuzjologii Laboratoryjnej z Bankiem Komórek Krwiotwórczych, Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHIT, ul. Indiry Gandhi 14, 02776 Warszawa, tel.: (22) 349 63 89, e-mail: [kjanik@ihit.waw.pl](mailto:kjanik@ihit.waw.pl)

Programy czuwania nad bezpieczeństwem krwi są na różnych etapach opracowania w zależności od regionu świata — w niektórych uczestnictwo w takich programach jest obowiązkowe, w innych dobrowolne, dlatego nie można mówić o programie powszechnym. W poszczególnych programach wymagania dotyczące potwierdzeń klinicznych i laboratoryjnych są różne. Zdarza się, że powikłanie uznane według kryteriów klinicznych za zakażenie bakteryjne nie zostaje potwierdzone, ponieważ nie ma dostępu do przetoczonego składnika krwi czy próbki krwi chorego lub postępowano z nim niewłaściwie albo przechowywano go w nieodpowiednich warunkach. W związku z tym liczbę zgłoszonych i potwierdzonych poprzetoczeniowych powikłań bakteryjnych można traktować jedynie jako „wierzchołek góry lodowej”; przypadki ujęte w sprawozdaniach dotyczących bezpieczeństwa krwi stanowią zaledwie część wszystkich zakażeń.

Według programu SHOT za potwierdzone zakażenie poprzetoczeniowe uznaje się każdy przypadek, gdy:

- u biorcy występują objawy zakażenia poprzetoczeniowego przy braku zakażenia przed transfuzją i braku dowodów na alternatywne źródła zakażenia;
- co najmniej jeden składnik przetoczony zakażonemu biorcy pochodził od dawcy, u którego stwierdzono to samo zakażenie;
- w co najmniej jednym składniku przetoczonym zakażonemu biorcy wykazano obecność czynnika chorobotwórczego.

Wood przedstawił metody wykrywania bakterii w składnikach krwi. Zalicza do nich: kontrolę jakości badań, rutynowe badania przesiewowe lub inne wstępne badania, kontrolę wizualną składników krwi przed wydaniem ich przez centrum krwiodawstwa lub szpitalne laboratorium oraz badania przed przetoczeniem, przy łóżku pacjenta: dokładne monitorowanie pacjentów w trakcie i po przetoczeniu. Podkreślił on, że w wielu krajach wstępne badania kontrolne koncentratów krwinek płytkowych wykonuje się rutynowo. Postępowanie takie jest uzasadnione, ponieważ koncentraty krwinek płytkowych należą do składników krwi najbardziej narażonych na ryzyko zakażeń bakteryjnych ze względu na warunki przechowywania (temperatura pokojowa) oraz fakt, że wykrycie obecności bakterii nie zawsze ma następstwa kliniczne. Zastosowanie czułych metod wykrywania bakterii pozwala zapobiec wydaniu i przetoczeniu zanieczyszczonych składników krwi [1].

W niektórych krajach dzięki procedurze monitorowania jakości KKP wydłużono okres ich przechowywania do ponad 5 dni.

Wyzwania związane z kontrolą jakości koncentratów krwinek płytkowych są duże i obejmują: biologiczne właściwości bakterii, na przykład bardzo ni-

skie początkowe *inoculum* w czasie pobierania krwi oraz kinetykę bakterii w początkowej fazie przed proliferacją, niektóre aspekty procedury przygotowania i dostarczania składników krwi o krótkim okresie przydatności, jak również niektóre aspekty odnoszące się do metod badawczych. Należy również pamiętać, że wiele bakterii potrzebuje do wzrostu odpowiedniego czasu (24–48 godz.).

Do wykrywania zakażeń bakteryjnych najczęściej stosuje się systemy BacT Alert 3D i Pall eBDS, ponieważ pomiary pH i glukozy, chociaż proste i niedroge, są jednak niewystarczająco dokładne i odpowiednie do rutynowego stosowania. Doświadczenia centrów krwiodawstwa oraz szpitali w wielu krajach wykazały na przestrzeni ostatnich kilku lat, że wyżej wymienione systemy są skuteczne w wykrywaniu bakterii zarówno w koncentratkach krwinek czerwonych, jak i w koncentratkach krwinek płytkowych. Jednak porównywalność wyników, a tym samym optymalizacja metod, może stanowić problem ze względu na:

- różnice w rodzajach badanych składników (składniki mogą pochodzić z aferezy lub krwi pełnej, metody wytwarzania mogą być różne — z dodatkiem roztworu wzbogacającego lub osocza);
- różny czas od pobrania próbek (3–36 godz.);
- wymagane objętości (3,5–10 ml składnika na każdą hodowlę);
- systemy badań, metody wykrywania;
- czas od pobrania próbek do momentu badania (0–24 godz.);
- całkowity czas trwania hodowli bakterii (5–7 dni);
- stosowanie hodowli tlenowych lub w połączeniu z beztlenowymi;
- dostępność badań potwierdzających;
- obserwację procesu przetoczenia składników krwi i przypadki kliniczne.

Nierozstrzygnięta pozostaje kwestia, czy w celu wykrycia zanieczyszczeń należy rutynowo dodawać beztlenowe hodowle bakterii do tlenowych. Badania przesiewowe z użyciem tlenowych i beztlenowych hodowli bakteryjnych umożliwiają zidentyfikowanie większej liczby drobnoustrojów niż przy użyciu samych tylko hodowli tlenowych; same beztlenowe hodowle rzadko wywołują poważne następstwa kliniczne.

Wśród przypadków bakteryjnych zakażeń poprzetoczeniowych zgłoszonych do *Food and Drug Administration* (od 2005 roku) w samym tylko roku 2009 znalazło się 5 powikłań spowodowanych przetoczeniem zakażonego koncentratu krwinek płytkowych. Większość zakażeń była wywołana przez tlenowce, a w jednym przypadku przez beztlenowca (*Limosum eubacterium*). Wielu bakterii wykrytych w hodowlach beztlenowych nie uznano za istotne pod względem klinicznym; wyższy wskaźnik wykrywalności można uzyskać tylko poprzez dodanie

hodowli tlenowych. Rola hodowli beztlenowych jako sposobu zwiększenia wykrywalności znaczących zanieczyszczeń bakteriami pozostaje nadal tematem dyskusji.

W Australii badania przesiewowe koncentratów krwinek płytkowych wprowadzono do rutynowego stosowania w kwietniu 2008 roku (system BacT Alert). Większość zidentyfikowanych organizmów należało do gatunku *Corynebacterium* lub *Propionibacterium*. Zidentyfikowano również ponad 40 gatunków bakterii uznawanych za potencjalnie istotne klinicznie, w tym *Klebsiella*, *Serratia* i *Clostridium*.

Należy pamiętać, że kontrola bakteryjna nie eliminuje całkowicie ryzyka zakażenia bakteryjnego, bowiem mogą pojawić się wyniki fałszywie ujemne. Znane są przypadki klinicznych poprzetoczeniowych zakażeń bakteryjnych po zastosowaniu koncentratu krwinek płytkowych, mimo że wyniki badań były ujemne. Trzeba więc zachować czujność nawet w przypadku stosowania wielu środków zapobiegawczych i metod wykrywania bakterii. Wykonanie ponownych badań przesiewowych pozwala zmniejszyć ryzyko zakażenia bakteryjnego, bo w chwili wydania składniki krwi są zazwyczaj nieco starsze — zatrzymano je bowiem w celu pobrania próbek do badań oraz ze względu na czas trwania badań.

Wood wymienił kilka metod szybkiego wykrywania bakterii bezpośrednio przed przetoczeniem. Zaznaczył również, że w opracowaniu jest wiele innych metod. Podkreślił, że cytometria przepływowa wydaje się metodą nieco mniej czułą niż metody oparte na hodowlach, ale można ją stosować do badania koncentratów krwinek płytkowych bezpośrednio przed przetoczeniem. Jest to metoda prosta i szybka, a niezbędny sprzęt jest dostępny w wielu laboratoriach. Metody biologii molekularnej, takie jak na przykład *real-time PCR*, cechuje duża czułość, a wynik można uzyskać w ciągu kilku godzin. Metoda immunologiczna umożliwia wykrywanie antygenów wspólnych dla bakterii Gram ujemnych i Gram dodatnich. Wydaje się ona nieco mniej czuła niż pozostałe, ale jest najlepiej dostosowana do małych objętości próbki, poza tym jest prosta i można ją wykonać bezpośrednio przed przetoczeniem, ponieważ wyniki są natychmiast dostępne. Wood stwierdził, że konieczne są dalsze badania, aby ustalić metodę najszybszą i nadającą się do rutynowego stosowania w centrach krwiodawstwa i szpitalach.

Hofer i wsp. przedstawili pracę, w której omówiono zastosowanie nowych multipleksów *real-time PCR* do wykrywania zakażenia bakteryjnego w koncentraty krwinek płytkowych [2]. Multipleksowy *real-time PCR* jest modyfikacją metody *real-time PCR*. W metodzie *real-time PCR* określenie *multi-*

*plex* odnosi się do wielu rodzajów sond stosowanych do rozróżnienia amplikonów powstałych w czasie reakcji. Hofer przypomniał, że poprzetoczeniowe zakażenie bakteryjne, zwłaszcza dotyczące KKP, nadal pozostaje wyzwaniem dla transfuzjologii. Wiele składników krwi przetacza się przed upływem wymaganego czasu inkubacji bakterii, dlatego należy jak najszybciej zbadać składnik krwi pod kątem obecności bakterii. Autorzy potwierdzili wysoką czułość metody *Light-Cycler real-time* z zastosowaniem wzmocnionych bakterii przy użyciu sondy hybrydizacji. Szeroki zakres 16-sekundowego PCR potrafi wygenerować wynik w krótkim czasie, dlatego jest to metoda lepsza niż metody hodowli.

Anthony i wsp. opracowali szybkie i proste badanie koncentratu krwinek płytkowych do wykrywania zakażeń bakteryjnych, oparte na technologii laserowego skanowania [3]. W badaniach wykorzystano koncentraty krwinek płytkowych z aferezy lub zlewane koncentraty krwinek płytkowych zawierające bakterie: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* lub *Bacillus cereus*. Uzyskano wyniki potwierdzające, że system Bac-Detect przy użyciu technologii skanowania laserowego jest szybką i skuteczną metodą kontroli zakażeń bakteryjnych przed przetoczeniem. Dzięki zastosowaniu tej metody można również szybko uzyskać kompletne końcowe protokoły badań.

Dotychczasowe osiągnięcia w zakresie poprawy bezpieczeństwa transfuzji są znaczne i wiele z opracowanych metod wprowadzono do rutynowego stosowania. Jednak pozostało jeszcze dużo do zrobienia. Należy stale dążyć do zmniejszenia liczby zakażeń bakteryjnych w składnikach krwi, przy czym badania przesiewowe są tylko jedną z metod. Trzeba kontynuować badania w celu opracowania metody optymalnej, możliwie dokładnej i pewnej. Należy również poszerzać wiedzę na temat zakażeń bakteryjnych, opierając się na doświadczeniach klinicznych, doskonaląc procedury postępowania w przypadku wykrycia sepsy, prowadząc rejestr niepożądanych zdarzeń oraz zwiększając świadomość tego, jak istotne znaczenie dla chorych ma odpowiednie zapewnienie bezpieczeństwa krwi.

## Piśmiennictwo

1. Wood E. Bacterial screening of blood products. *Vox Sanguinis* 2010; 5 (1): 46–51.
2. Hofer K., Danzer M., Stabenheiner S., Süßner S., Pröll J., Gabriel C. Application of a novel multiplex real-time PCR assay for sensitive detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (1): 11–12.
3. Anthony R.S., Greetham H., Pearce S., Owen H. Rapid detection of bacterial contamination of platelets using laser scanning technology. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (1): 12.